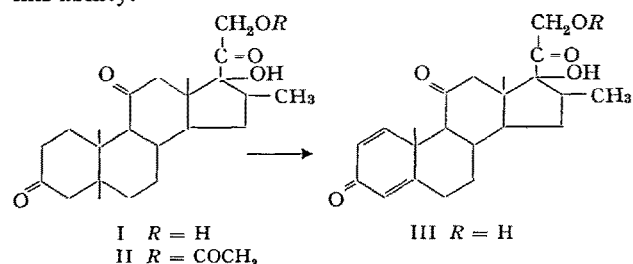


In the following paper we wish to report the conversion of 16 β -methyl-5 α -dehydrocortisone (I) to 16 β -methylprednisone (III) by a strain of *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946) which was previously unknown to possess this ability.



With this strain the introduction of the two double bonds into the saturated A ring of the steroid molecule proceeded fairly rapidly. In some cases the Δ_1 compound was found as a side product and there were some indications that it might be considered as an intermediate step to the $\Delta^{1,4}$ dehydrogenation, since it always appeared during the earlier hours of the transformation. If the saturated steroid was added as 21-acetate (II), the acetate group was hydrolyzed and the conversion product was isolated as the free alcohol.

The fermentation was carried out as follows: One slant culture of *Corynebacterium simplex* was used to inoculate a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of medium of the following composition: peptone 0.6%, casein 0.4%, yeast autolysate 0.3%, meat extract 0.15%, glucose 0.1%. After being incubated on a rotary shaker at 200 rpm and at a temperature of 28°C for 18 h, the content of one flask was used to inoculate a 10 l glass jar containing 4 l of medium of the following composition: Basamin⁵ 1.1%, KH_2PO_4 0.4%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8%. This mixture was incubated at 28°C for 14 h under constant agitation at 500 rpm and aeration at the rate of 1 v/v per minute. Following this growth period, 1.5 g of 16 β -methyl-5 α -dehydrocortisone were added in a solution of 30 ml of methanol. Agitation and aeration were continued at the same rate. After a conversion period of 20 h, the whole broth was extracted exhaustively with chloroform and the

extract concentrated under reduced pressure to a small volume. This solution, after having been treated with a small quantity of animal charcoal, was poured into petrol ether in order to precipitate the steroid compounds. This crude material was analyzed by means of thin layer chromatography using Silicagel G as adsorbent. The development was carried out ascendingly with ethylacetate as solvent. The steroidal compounds were visualized by spraying the plate with concentrated sulfuric acid and heating for 20 min to 100°C. Synthetic 16 β -methylprednisone was spotted as standard on the same plate. Transformation product and standard had the same R_f value. In addition traces of the Δ_1 compound could be detected. Two methods were used for purification of the crude product: double crystallization from ethanol-water and ethyl acetate; acetylation of the $\Delta^{1,4}$ alcohol with acetic anhydride in pyridine and subsequent crystallization of $\Delta^{1,4}$ -21-acetate from ethylacetate. The purity of the crystalline transformation product was established by ultraviolet absorption and optical rotation i.e. 16 β -methylprednisone λ_{max} 238 m μ , $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 416$ (methanol), $[\alpha]_D + 198.4^\circ$ (Dioxane), m.p. 200–205°; 16 β -methylprednisone-21-acetate λ_{max} 238 m μ , $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 359$ (methanol), $[\alpha]_D + 207.9^\circ$ (Dioxane), m.p. 226–229°. In both cases the infrared spectra are identical with those of authentic samples. The yields of this transformation were in the order of 46%.

Zusammenfassung. Über die mikrobiologische Umwandlung des 16 β -Methyl-5 α -Dehydrocortisons in 16 β -Methylprednison durch einen Stamm von *Corynebacterium simplex* wird berichtet. Mit Hilfe dieser Bakterienkulturen ist es möglich, in relativ kurzer Zeit die beiden Doppelbindungen in den Stellungen 1 und 4 im A-Ring des 16 β -Methylprednisons einzuführen.

D. KLUEPFEL and C. CORONELLI

Research Laboratories of Lepetit S.p.A., Milano (Italy), May 23, 1962.

⁵ Anheuser-Busch, St. Louis, Mo., U.S.A.

Fermenthistochemische Untersuchungen am Übergangsepithel verschiedener Säugetiere¹

Das Übergangsepithel (ÜE) der ableitenden Harnwege – durch seine Fähigkeit zur heterotopen Ossifikation erneut im Blickfeld des Interesses – besitzt eine hohe Bedeutung für den Schutz der umgebenden Gewebe gegenüber den Einwirkungen des Harns. Dieser Schutzfunktion dienen der reiche Glykogengehalt^{2–11}, die Sekretion von Harnmukoiden^{3–5, 11–15} und eine bedeutende Fermentausstattung, über die hier berichtet werden soll.

Die hohe Aktivität der unspezifischen alkalischen Phosphatase ist am längsten bekannt¹⁶. Das Vorkommen der unspezifischen Esterase konnte nur bei manchen *Species* nachgewiesen werden¹⁷ und wurde auch unter experimentellen Bedingungen bestimmt¹⁸.

Wir untersuchten an nativen, kryostatgeschnittenen Harnblasen (10 bis 14 μ) von Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Affe (*Macaca irus*) partiell die Aktivität von 9 Enzymen im ÜE (Tabelle). Die Natur des positiven oder negativen Reaktionsausfalles wurde durch histo-

¹ Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

² W. SCHULTHEIS, Diss. Göttingen (1933).

³ J. P. GAUER, Mitt. naturf. Ges. Bern, N.F. 6, 85 (1949).

⁴ KLARA GÖLDI, Z. mikrosk. anat. Forsch. 58, 256 (1952).

⁵ T. J. MENDE und E. L. CHAMBERS, J. Histochem. Cytochem. 5, 99 (1957).

⁶ F. R. JOHNSON und R. M. H. McMINN, Biol. Rev. 35, 364 (1960).

⁷ J. K. CHOI, Anat. Rec. 139, 214 (1961).

⁸ L. I. FALIN, Acta Anat. 46, 244 (1961).

⁹ A. J. FRIEDENSTEIN, Acta Anat. 45, 31 (1961).

¹⁰ A. J. FRIEDENSTEIN, Arch. Anat. Histol. Embriol. 38, 61 (1960) (Russ. mit engl. Zusammenfassung).

¹¹ H. AMON und G. PETRY, 58. Vers. Anat. Ges., Genua (1962), im Druck.

¹² A. S. DOGIEL, Arch. mikr. Anat. 35, 389 (1890).

¹³ A. LENDORF, Anat. Hefte 17, 55 (1901).

¹⁴ V. v. EBNER, in A. KOELLIKER, Handbuch der Gewebelehre des Menschen, 3. Bd. (W. Engelmann, Leipzig 1902).

¹⁵ V. PRETO PARVIS und U. LUCARELLI, Arch. Ital. Anat. Embriol. 60, 1 (1955).

¹⁶ G. GOMORI, J. Cell comp. Physiol. 17, 71 (1941).

¹⁷ M. M. NACHLAS und A. M. SELIGMAN, Anat. Rec. 105, 677 (1949).

¹⁸ Z. VACEK und O. SCHÜCK, Anat. Rec. 136, 87 (1960).

Enzymnachweis und Inkubationsverfahren

	Cavia	Kanin- chen	Macaca	Ratte
Succinodehydrogenase nach GOEBEL und PUCHTLER (1955); pH 7,6; Inkubation 2 h; Tetrazoliumpurpur	(+)	(+)	(+)	(+)
Unspezifische Esterase Azomethode nach GOMORI (1952) pH 8,1; Inkubation 20 min; Echtblau RR	+		+	+
Cholinesterase Azomethode nach RAVIN et al. (1953); pH 7,8; Inkubation 20 min; Echtblau RR	—		+ ?	+ ?
Unspez. alkal. Phosphomono- esterase Metallsalzmethode nach GOMORI (1949); pH 9,2; Inkubation 30 min	+	+	+	+
Unspez. saure Phosphomono- esterase Metallsalzmethode nach GOMORI (1950, 1952); pH 5,3; Inkubation 1 h		+	(+)	(+)
5'-Nucleotidase nach NAIDOO und PRATT (1951–1954) pH 6,6; Inkubation 15–45 min			—	—
Glukose-6-phosphatase nach CHIUOINE (1953); Abpufferung mit Acetat nach HERMAN und PADYKULA (1956); pH 6,5; Inkubation 10–15 min			—	—
Amylophosphorylase nach TAKEUCHI et al. (1955, 1956) pH 5,7–5,8; Inkubation 1–4 h; Jodreaktion	+		+	+
Carboanhydrase nach GOEBEL und PUCHTLER (1954); mit und ohne Aceton- fixierung; Inkubation 1 h	—	—		—

Zeichenerklärung: (+) schwach positiv; + positiv; — negativ;
+ ? hierbei dürfte es sich um eine falsche positive Reaktion durch
unspezifische Esterasen handeln.

chemische und Gewebskontrollen (glatte Muskulatur der
Harnblase, Niere, Skelettmuskulatur) gesichert.

Von den 9 getesteten Enzymen konnten fünf im ÜE
nachgewiesen werden. Auffallend ist die bei den verschie-
denen *Species* weitgehende Übereinstimmung der enzy-
matischen Reaktionsprodukte von Succinodehydrogenase,
unspezifischer Esterase, saurer Phosphatase und Amylo-
phosphorase. Die geringen Differenzen von Lokalisation
und Intensität der Reaktionsausfälle dürften artspezi-
fischer Natur sein und ihre Ursache in der unterschied-
lichen Reaktion und Osmolarität des Harns der Versuchs-
tiere haben.

Die mitochondrial gebundene *Succinodehydrogenase*, die
wir als einen Repräsentanten der Enzymkette des Zitro-
nensäurecyclus untersuchten, erschien im gesamten ÜE
gleichmässig schwach positiv. Die *unspezifische Esterase*
wies in allen untersuchten Fällen eine sehr hohe Aktivität
auf. Dagegen ergab der Nachweis der *unspezifischen sauren*

Phosphatase einen schwächeren Reaktionsausfall. Beim
Kaninchen war dieser noch deutlich positiv und gleich-
mässig über das Epithel verteilt. Bei Affe und Ratte liess
das ÜE nur eine sehr schwache Präzipitation des Blei-
sulfides erkennen. Dieser Befund ähnelt den Beobach-
tungen GÖLDIS⁴.

Lediglich bei dem Nachweis der *unspezifischen alka-
lischen Phosphatase* (a. P.), die im ÜE eine besonders hohe
Aktivität besitzt, treten eindrucksvolle topistische Unter-
schiede des präzipitierten Kobaltsulfides bei den ein-
zelnen *Species* zutage. Wie schon an mannigfachem Tier-
material nachgewiesen wurde^{4–6,9,10,16,18–20}, findet sich
die a. P. vorzugsweise im basalen und intermediären Zell-
bereich des ÜE sowie im angrenzenden subepithelialen
Bindegewebe. Diesen Verteilungsmodus konnten auch
wir in der Harnblase des Kaninchens und Meerschwein-
chens feststellen¹¹. Bei zu langer Inkubation (> 30 min)
werden die Kobaltsulfidniederschläge so dicht, dass
Epithel- und Bindegewebsstrukturen kaum mehr vonein-
ander abgrenzbar sind. Die superfizialen Epithelzellen
zeigen keine Aktivität. Bei der Ratte fällt die Reaktion
insgesamt schwächer aus, das Reaktionsprodukt bleibt
auf die basalen zwei Drittel des Epithels beschränkt und
bezieht nur die Wandungen der subepithelialen Kapil-
laren ein.

Die Harnblase des Affen zeigt nun ein völlig anderes
Bild der a. P.: ihre Aktivität ist im Harnepithel selbst und
im Propriabindgewebe nur gering, dagegen lassen die
subepithelialen Kapillaren und die Wandungen grösserer
Blutgefässe eine sehr hohe Aktivität erkennen. Das gleiche
gilt für isolierte Züge glatter Muskulatur, die sich aus der
Muskelwand der Harnblase lösen, nahe an das Epithel
heranziehen und als Muscularis mucosae bezeichnet
werden könnten. Diese nur bei *Macaca irus* beobachteten
Muskelzüge sind von den Kobaltsulfidniederschlägen tief
geschwärzt, während die übrige Wandmuskulatur der
Harnblase keine Enzymaktivität nachweisen lässt.

Nach GÖLDI⁴ soll die a. P. des ÜE an allen Phosphory-
lierungs- und Dephosphorylierungsvorgängen teilhaben
und die nächste Verwandtschaft mit der a. P. des Kno-
chens besitzen, womit ein Hinweis auf die bekannte Ossi-
fikationspotenz der transplantierten Harnblasenschleim-
haut gegeben ist.

Während TAKEUCHI in einer früheren Arbeit²¹ im ÜE
keine Aktivität der *Amylophosphorylase* antraf, erwähnte
er später²² kurz das Vorkommen der Amylophosphorylase
und der Amylo-1, 4 → 1, 6-transglukosidase in der Schleim-
haut des Ureters und der Harnblase. Im Rahmen unserer
Untersuchungen überprüften wir die widersprüchlichen
Angaben. Dabei erwies sich die Takeuchische Methode der
Joddarstellung des gebildeten Polysaccharides^{21–24} für
den Nachweis der Amylophosphorylase von hohem Wert.
Mit diesem Verfahren konnte die synthetische Aktivität
dieses Enzyms im ÜE gesichert werden. Nach den mit Jod
resultierenden Farbqualitäten zu schliessen, dürfte bei
unvollständiger Hemmung des «branching factor» (Amylo-
1, 4 → 1, 6-trans-glukosidase) durch 20%igen Äthanol-
zusatz die Synthese vielfach über die blau sich anfärbende
Amylose hinaus bis zu Amylopectin und kleineren Glyko-
geneinheiten gegangen sein. Das zeigten die braunviolet-

¹⁹ G. BOURNE, Quart. J. exp. Physiol. 32, 1 (1943).

²⁰ B. F. MARTIN, J. Anat. Lond. 92, 286 (1958).

²¹ T. TAKEUCHI, K. HIGASHI und S. WATANUKI, J. Histochem. Cyto-
chem. 3, 485 (1955).

²² T. TAKEUCHI, J. Histochem. Cytochem. 6, 208 (1958).

²³ T. TAKEUCHI und H. KURIAKI, J. Histochem. Cytochem. 3, 153
(1955).

²⁴ T. TAKEUCHI, J. Histochem. Cytochem. 4, 84 (1956).

ten, olivbräunlichen oder olivgrünen Farbtöne im ÜE an, während die zur Kontrolle synchron-inkubierte Skelettmuskulatur tiefdunkelblau mit Jod reagierte. Ohne Äthanolzusatz verlief die Polysaccharidsynthese bis zu dem mit Jod mahagonibraun sich anfärbenden Glykogen. Das Verteilungsmuster des enzymatisch aufgebauten Polysaccharides entspricht weitgehend dem natürlichen Glykogenvorkommen im ÜE im Sinne einer Zunahme von der Epithelbasis zur -oberfläche¹¹.

Die Ergebnisse werden an anderer Stelle ausführlich dargestellt.

The Biological Activities of Arginine-Vasotocin Obtained by a New Synthesis

Arginine-vasotocin (= Arg⁸-oxytocin = Ile⁸-arginine-vasopressin) was first synthesised in 1958¹. One year later, a peptide of this constitution was discovered in the pituitary of some non-mammalian vertebrates^{2,3}. As the data of the literature^{1,4} on the biological activities of arginine-vasotocin do not entirely agree, we have undertaken a new improved synthesis⁵ of this peptide and examined the biological properties of the pure synthetic product thereby obtained.

N-CBO-L-proline was condensed by the mixed anhydride procedure with *p*-nitro-phenyl G-tosyl-L-arginate and the dipeptide thus obtained was reacted with glycineamide, giving N-CBO-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide. Removal of the CBO protecting group and condensation with N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-azide⁶ afforded N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide. After removal of the CBO protecting group this hexapeptide was condensed with *p*-nitro-phenyl N-tosyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate⁷ to N-tosyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (m.p. 236–238°. $[\alpha]_D^{25} = -56^\circ$ in 95% acetic acid. Analysis calculated for C₇₁H₉₃O₁₈N₁₅S₄: C 55.3; H 6.1; O 16.6; N 13.6; S 8.3. Found: C 55.1; H 6.3; O 17.0; N 13.4; S 8.4). Removal of the protecting groups by treatment with sodium in liquid ammonia, followed by oxydation with air, purification by counter-current distribution in the system sec.-butanol/water/trifluoroacetic acid (120:160:1), conversion in the acetate form and lyophilisation, afforded homogeneous arginine-vasotocin. A sample was dried for 8 h at 100° and gave correct amino acid and elementary analysis (diacetate).

The pharmacological qualities of arginine-vasotocin obtained by the above described synthesis were investigated in different experimental sets generally adopted in studies on the biological activities of the neurohypo-

Summary. Histochemical investigations on enzyme activities in the transitional epithelium showed positive reactions with succinic dehydrogenase, esterase, alkaline phosphatase, acid phosphatase and amylophosphorylase (incl. branching factor). Negative results were drawn from cholinesterase, 5'-nucleotidase, glucose-6-phosphatase, and carbonic anhydrase.

H. AMON und G. PETRY

Anatomisches Institut der Universität Marburg an der Lahn (Deutschland), 19. Juli 1962.

physial hormones. Three tests were used to demonstrate and measure effects peculiar to oxytocin. These included the rat uterus *in vitro*⁸, the blood pressure of the chicken^{9,10} and the mammary gland of lactating rabbits^{11,12}. Two tests were used to detect and measure biological activities characteristic of vasopressin, namely the blood pressure of rats¹³ and the diuresis of rats in alcohol anaesthesia^{14–16}. The Third International Standard for Oxytocic, Vasopressor and Antidiuretic Substances¹⁷ served as a reference standard and the activities were expressed in terms of International Units per mg.

The values obtained in the present study are summarised in the first line of the Table. The figures given for another synthetic preparation of this hormone¹ are shown

¹ P. G. KATSOYANNIS and V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chem. **233**, 1352 (1958).

² B. T. PICKERING and H. HELLER; W. H. SAWYER, R. A. MUNSICK, and H. B. VAN DYKE; P. G. KATSOYANNIS, and V. DU VIGNEAUD, Nature **184**, 1463 (1959).

³ J. CHAUVET, M.-T. LENCI, and R. ACHER, Biochim. biophys. Acta **38**, 571 (1960).

⁴ H. HELLER and B. T. PICKERING, J. Physiol. **155**, 98 (1961).

⁵ For details see: R. L. HUGUENIN and R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta, **45**, 1629 (1962).

⁶ R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, and J.-P. WALLER, Helv. chim. Acta **38**, 1491 (1955).

⁷ P.-A. JAQUENOUD and R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **45**, 1462 (1962).

⁸ P. HOLTON, Brit. J. Pharmacol. **3**, 328 (1948).

⁹ J. M. COON, Arch. int. Pharmacodyn. **62**, 79 (1939).

¹⁰ R. E. THOMPSON, J. Pharmacol. exp. Therap. **80**, 373 (1944).

¹¹ H. B. VAN DYKE, K. ADAMSON, Jr., and S. L. ENGEL, Recent Progr. Hormone Res. **11**, 1 (1955).

¹² B. BERDE and A. CERLETTI, Gynaecologia **144**, 275 (1957).

¹³ British Pharmacopoeia, Pharmaceutical Press, London (1958).

¹⁴ W. A. JEFFERS, M. M. LIVEZEY, and J. H. AUSTIN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **50**, 184 (1942).

¹⁵ W. H. SAWYER, Endocrinology **63**, 694 (1958).

¹⁶ B. BERDE and A. CERLETTI, Helv. physiol. Acta **19**, 135 (1961).

¹⁷ D. R. BANGHAM and M. V. MUSSETT, Bull. Org. mond. Santé **19**, 325 (1958).

Biological activities of arginine-vasotocin in international units per mg*

	Rat uterus (isolated)	Chicken blood pressure	Rabbit mammary gland	Rat blood pressure	Rat antidiuresis
Our synthetic product	115 ± 15	285 ± 40	ca. 210	245 ± 15	250 ± 35
	90 ± 12	224 ± 32	ca. 165	193 ± 12	197 ± 28
KATSOYANNIS and DU VIGNEAUD ¹	75	150		125	
HELLER and PICKERING ⁴	40		119	71	71

* The activities printed in normal type refer to lyophilised peptide, those printed in heavy type to the peptide itself (free base, without solvent).